

筑波大学

博士（医学）学位論文

DA
2376
1999
HG

セロトニンによるイオノトロピック型
グルタミン酸受容体の発現調節

1999

筑波大学大学院博士課程医学研究科

首藤文洋

寄贈
首藤文洋氏

00003599

目次

	ページ
第1章 緒論	
1. 興奮性神経伝達物質と神経伝達の調節	5
2. セロトニンと神経伝達の調節	7
3. 限局投射と広範投射	8
4. 研究の目的	10
第2章 材料と方法	11
1. 実験動物に対する薬物投与と組織の摘出	11
2. 大脳皮質セロトニン濃度の測定	12
3. 放射性リガンド結合実験	13
① 遠心法	13
② 濾過法	14
4. 定量的イムノブロット実験	15
第3章 結果	17
1. pCPA 7日間投与のイオノトロピック型各受容体発現に対する影響	17
2. 増加を示す AMPA 型受容体サブタイプの特異性：定量的イムノブロット実験	20
3. 5-HT _{2A} 型セロトニン受容体の AMPA 型受容体 GluR2 サブタイプに対する影響	21

第4章	考察	22
1.	薬物投与の影響	22
2.	大脳皮質における各型グルタミン酸受容体密度変化の部位 特異性	22
3.	AMPA型グルタミン酸受容体発現に対する影響	23
①	pCPAによる大脳皮質セロトニン濃度減少の各イオノト ロピック型グルタミン酸受容体に対する影響	23
②	セロトニン濃度の減少によって影響を受ける受容体サブ タイプの同定	24
③	GluR2発現調節に関与するセロトニン受容体の同定	25
④	5-HT _{2A} 受容体によるGluR2受容体発現調節の意義	26
4.	カイニン酸型受容体発現に対する影響	29
5.	NMDA型受容体発現に対する影響	30
第5章	結論	31
	謝辞	32
	文献	33
	付図・表	
	参考論文	

第1章 緒論

1. 興奮性神経伝達物質と神経伝達の調節

神経細胞の基本的な機能は他の神経細胞から受けた興奮を次の神経細胞に伝達することである。この神経細胞間の興奮伝達はシナプス構造の中で、主として化学物質（伝達物質）を媒介として行われている。そして、この興奮性神経伝達のほとんどをグルタミン酸が伝達物質として担っている (Monaghan *et al.*, 1989)。

神経細胞間の興奮伝達において中心的な役割を果たすものがイオノトロピック型受容体である。神経細胞はシナプス後部にある陽イオンチャンネルの開口により細胞内に Na^+ などの陽イオンが流入し、興奮性シナプス後電位 (EPSP) が生じる。一つのニューロンは多数のシナプス入力を受けており、同時に多数の EPSP が生じている。これらの EPSP の時間的空間的総和が軸索小丘（軸索初節）での閾値を超えたときに発火が起こり神経終末に興奮を伝達すると考えられている (Nicholls, 1994)。神経伝達物質として興奮性神経終末から放出されるものがグルタミン酸であり、放出されたグルタミン酸と結合して開口するリガンドゲイテッド陽イオンチャンネルがイオノトロピック型グルタミン酸受容体である (Monaghan *et al.*, 1989; Dingledine *et al.*, 1999)。

これまでに大きく3種類のイオノトロピック型グルタミン酸受容体が知られ

ている。これらの受容体は受容体サブタイプがオリゴマーを形成することでリガンドゲイテッド陽イオンチャンネルとして機能している。NMDA 型受容体は高い Ca^{2+} 透過性を持つ。この受容体の陽イオン透過性は、静止膜電位近傍では Mg^{2+} により抑制されているが、膜電位の上昇に伴って Mg^{2+} による抑制が解除される。このような特異な性質をもつ NMDA 型受容体は、ヘップ型シナプスの可塑性において中心的役割を果たしていると考えられ、海馬シャッファー側枝-CA1 錐体細胞間シナプスで見られる長期増強現象に主要な役割を持っている (Nowark *et al.*, 1984; Dingledine *et al.*, 1999) .

一方、AMPA 型受容体は主に Na^+ を透過させることにより EPSP を発生させると考えられており、生じる EPSP は急激な電位変化をもたらすがあまり持続しない。この性質から AMPA 型の受容体はシナプス後細胞の膜電位を上昇させ、NMDA 型受容体の Mg^{2+} ブロックを外すことが重要な役割であると考えられてきた (Dingledine *et al.*, 1999) . しかし近年、AMPA 型受容体チャンネルを形成する4つのサブユニット (GluR1-4) のうち、GluR2 が構造的に Ca^{2+} 透過を阻害し、GluR2 を含まない受容体チャンネルが Ca^{2+} 透過性を持つことが報告された (Bochet *et al.*, 1994; Iino *et al.*, 1994; Hollman and Heinenmann, 1994) . さらに AMPA 型受容体のみでも長期増強現象 (LTP) が起こることや、シナプス後構造である樹状突起棘の形成・維持に AMPA 型受容体を介する微小シナプス後電位 (mEPSP) が必要であることが報告されるなど (Turner *et al.*, 1982; Jia *et al.*, 1996; McKinney *et al.*, 1999) この型の受容体が神経伝達において果たす役割の多様性が注目されている。

また、カイニン酸型受容体が発生する EPSP の性質は AMPA 型受容体と同

様であり, AMPA 型受容体とともに non-NMDA 型とも称される (Dingledine *et al.*, 1999) . NMDA 型や AMPA 型が後シナプス部に局在するのに対して, カイニン酸型は前シナプス部にも発現していることからシナプス前調節に関与していることが形態学的に示唆され (Petralia *et al.*, 1994) , それを裏付ける報告もされている (Cossart *et al.*, 1998) が未だその役割はほとんど明らかにされていない.

以上から, イオノトロピックグルタミン酸受容体は興奮性神経伝達の主な担い手であり, サブタイプの組み合わせにより生じる性質の異なる受容体が混在する事で多様な伝達調節を行っていることが示唆されている.

2. セロトニンと神経伝達の調節

セロトニンは消化管粘膜や血小板のほかに中枢神経系に存在していることが確認されて以来, 古典的神経伝達物質の一つとして研究されてきた (Twarog and Page, 1953) . セロトニンは中枢神経系のほぼ全ての部位に分布しており, 高次神経機能に深く関わっていることが知られている (Jacobs and Azmitia, 1992) . 認知, 情動, 感覚, 運動, サーカディアンリズム, 食欲, 体温, 攻撃性, 性行動など多岐にわたる脳機能をセロトニンは調節している (Carlsson, 1987; Sandyk, 1992) . そして, 鬱病, 精神分裂病, 痴呆といった精神神経疾患の発症機構に重要な役割をしていることが指摘されており (Sandyk, 1992) , 脳機能を考える上でセロトニンの重要性が近年再認識されている.

セロトニンが神経系で果たす役割の一つに, 非神経伝達物質的役割としてシナプスの形成・維持が挙げられる. セロトニンの神経線維が個体の発生段階で

一時的に増加する現象がラットやニワトリなどを使った研究で報告され (Kojima *et al.*, 1988; Ozaki *et al.*, 1991) , この時期にはまた, シナプス数が急激に増加する臨界期でもある (Chen *et al.*, 1997) . この一時的に増加するセロトニンがニワトリの脊髄ではシナプスの形成を促進する作用を持ち, かつ成体でもシナプスの維持に関与していることが明らかにされた (Okado *et al.*, 1993; Chen *et al.*, 1994) . このことはセロトニンが神経伝達の可塑性に重要な役割を果たす事を示しており, 高次神経機能の調節機序を解明する上で重要な糸口になると考えられる.

前述した様なセロトニン機能の多様性は, 現在までのところ 15 種類が知られているセロトニン受容体サブタイプの多様性に裏付けされていると考えられる. 加齢, 可溶性アミロイドの生成, 精神分裂病の治療, 鬱病の病態生理などに密接に関連するセロトニン 2A 型 (5-HT_{2A}) 受容体はセロトニン受容体サブタイプの中で最もメジャーなサブタイプと考えられてきた (Hoyer *et al.*, 1994) . 最近の研究により, セロトニンによるシナプスの形成と維持機能には 5-HT_{2A} 受容体が介在することが明らかになった (Niitsu *et al.*, 1994) . 更に, 5-HT_{2A} 受容体蛋白質の免疫組織化学法により, グルタミン酸作動性と考えられる大脳皮質の非対称性シナプスの後シナプス膜肥厚部に 5-HT_{2A} 受容体が局在していることが確かめられ, 5-HT_{2A} 受容体によるシナプス後細胞でのグルタミン酸神経伝達調節メカニズムの存在が示唆された (Hamada *et al.*, 1998) .

3. 限局投射系と広範投射系

セロトニンをはじめとする生体アミンを含有する神経線維は中枢神経系の広

い部位の不特定の標的領域に分布することが知られている。しかし、それらの線維を出している細胞体は脳幹に局在している (Fuxe and Ungerstedt, 1968; Jacob and Azmitia, 1992)。このような投射様式は広範投射系 (global projection system, volume transmission) と呼ばれている。それに対してグルタミン酸などアミノ酸系伝達物質を含有する神経線維はコンピューター型回路のように、限局した部位の特定の標的に投射していることから、点对点投射系 (point-to-point projection) と呼ばれている。

広範投射系の一つであるセロトニン神経系と、点对点投射系のうち主たる伝達系であるグルタミン酸神経系の相互作用については、これまでにグルタミン酸の放出調節を中心とした研究が報告されている。電気生理学的実験からセロトニンはグルタミン酸作動性神経細胞の発火に影響することや、グルタミン酸作動性シナプスでの前シナプス抑制効果 (Lee *et al.*, 1986; Reynolds *et al.*, 1988; Eaton and Salt, 1989; Schmitz *et al.*, 1995; Shupliakov *et al.*, 1995; Maura and Raiteri, 1996) , さらにセロトニン受容体サブタイプの一つである 5-HT_{1A} 型受容体の作動薬がシナプス後細胞に対してその神経終末からのグルタミン酸放出を抑制するという報告もされている (Maura and Raiteri, 1996; Matsuyama *et al.*, 1997) 。以上の研究からセロトニンは様々な脳の領域でグルタミン酸神経伝達系の活動に影響する事が示されてきた。

しかし、興奮性神経伝達に重要な役割を果たすイオノトロピック型グルタミン酸受容体に対するセロトニンの作用はほとんど検討されていない。これまでに Menini らが、³H]グルタミン酸を用いた受容体結合実験でセロトニンが海馬のグルタミン酸受容体発現量を調節するということを報告している (Mennini

and Miari, 1991) . しかし, [³H]グルタミン酸に対してはメタボトロピック型受容体を含む非常に多様なグルタミン酸受容体が結合する (Dingledine *et al.*, 1999) . それぞれの受容体は局在と機能が異なっていることから, それぞれの受容体サブタイプ別に検討していく必要がある.

4. 研究の目的

本研究は前述した背景から, セロトニンが各イオノトロピック型グルタミン酸受容体の発現にどのように影響しているか明らかにすることを目的とした.

第2章 材料と方法

1. 実験動物に対する薬物投与と組織の摘出

(実験動物)

本研究には 48 頭の成熟期の雄ラット (Wistar 系, 6 週齢, 体重 150~160 g ; SEASCO, 埼玉) を実験動物として用いた. ラットは 12 時間の明暗サイクルの保たれた 24 °C の飼育室で, 1 ケージあたり 2 - 3 頭, 自由に飼料と水を摂取できる状態で飼育した. 被験群の動物には異なる 2 用量 (10 および 100 mg/kg 体重) の p-chlorophenylalanine methylester (pCPA: Sigma) を生理的食塩水に溶解して投与開始日を基準として 1, 2, 4, 6 日目に腹腔内に投与した. NMDA 型受容体のリガンドである [³H]MK-801 および AMPA 型受容体の高い親和性を持つ (S)-[³H]AMPA を用いた結合実験と定量的イムノブロット測定においては高濃度 (100 mg/kg 体重) のみを用いた. 対照群の動物には生理的食塩水のみを投与した.

pCPA 100 mg/kg 投与群と 5-HT_{2A} 受容体の選択的アンタゴニストであるケタンセリン (ketanserin tertrate: RBI) 10 mg/kg 投与群を比較する実験で, 投与期間 7 日間のものでは pCPA を 1, 2, 4, 6 日目に, ケタンセリンを 1 - 6 日目に連日投与した. 投与期間 4 日のものでは pCPA およびケタンセリンともに

1 - 3 日目に連日投与した。各実験の対照群はケタンセリン投与群と同じ日程で生理的食塩水のみを投与した。

(大脳皮質の摘出)

薬物投与後 7 日目 (pCPA およびケタンセリン 4 日間投与実験においては 4 日目) に動物を断頭し、大脳皮質をすばやく摘出した。(S)-[³H]AMPA 結合実験を除く放射性リガンド結合実験には大脳皮質を前頭部皮質 (視交叉上部より吻側)、頭頂部皮質 (視交叉上部から視床下部尾側端上部) および後頭部皮質 (視床下部尾側端上部より尾側) の 3 部位に分割後、また、定量的イムノブロット測定と(S)-[³H]AMPA 結合実験には大脳皮質全体を液体窒素中で急速凍結して -80 °C に保存した。

2. 大脳皮質セロトニン濃度の測定

被験群および対照群各個体の大脳皮質のセロトニン含量は、高速液体クロマトグラフィー電気化学検出法 (HPLC-ECD) を用いて測定した (Hayashi *et al.*, 1998)。急速凍結した大脳皮質標本を内部標準試薬としてイソプロテレノールを加えた 100 μM エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) / 0.2 N 過塩素酸溶液中でホモジェナイズした。移動相として 0.03 M 酢酸ナトリウム 3 水和物, 0.065 M クエン酸 1 水和物, 30 mg/l 1-オクタンスルホン酸ナトリウム塩, 5 mg/l EDTA 2 ナトリウム, 5 % メタノール (pH 3.0) を用いて, C₁₈ 逆相カラム (150 mm × 3.9 mm: MA-5ODS, エイコム, 京都) で分離を行った。HPLC-ECD により検出されたピークの同定と定量化は既知量の標準試薬によるピークとの

比較によって算出した。結果の統計処理においては Student の t-検定を使用した。

3. 放射性リガンド結合実験

① 遠心法

遠心法は遠心分離による沈渣として膜サンプルを回収する結合実験法で、比較的親和性の低いリガンドでも非特異的吸着を低く押さえられる特質があるため、 $[^3\text{H}]$ AMPA および $[^3\text{H}]$ カイニン酸結合実験に用いた (Beaumont *et al.*, 1979; Olsen *et al.*, 1987) 。凍結保存していた大脳皮質組織を湿重量に対して 10 倍量の氷冷した 0.32 M Sucrose / 1 mM EGTA 溶液 (pH 7.2) の中でポリトロンホモジェナイザーを用いてホモジェナイズした。この懸濁液を 4°C で 1,400 x g, 10 分間遠心し、その上清を 36,000 x g, 30 分間再遠心した。こうして得られた沈渣に対して再懸濁および再遠心の操作を 2 回繰り返して、よく洗浄したものを P2 膜サンプルとして結合実験に供した。

$[^3\text{H}]$ AMPA (NEN, specific activity 1935.1 GBq/mmol) , $[^3\text{H}]$ カイニン酸 (NEN, specific activity 2146.0 GBq/mmol) および (S)- $[^3\text{H}]$ AMPA (NEN, specific activity 1480.0 GBq/mmol) を用いた結合実験では遠心法を、NMDA 型興奮性アミノ酸受容体に対する $[^3\text{H}]$ MK-801 を用いた結合実験では後述の濾過法をそれぞれ用いて実験を行った。各動物の大脳皮質の P2 膜サンプルをアッセイバッファー (0.1 M Tris-HCl pH 7.5, 0.1 mM EGTA) で最終蛋白質濃度が 0.5 から 1.0 mg になるように懸濁した。この時の懸濁液について HPLC-ECD 法による測定で確認したところ、モノアミンおよびその代謝物は検出されな

かった。この懸濁液に放射性リガンドを加えて氷冷下で 45 分間インキュベーションを行い、その後 20,000 x g, 10 分間 4°C で遠心分離した。反応させる放射性リガンドの濃度は [³H]AMPA および [³H]AMPA 結合実験では 5-100 nM の間に設定し、20 nM を越える濃度については置換法により、非放射性リガンドと共用した。また、(S)- [³H]AMPA 結合実験では 1.5-1000 nM の間に設定し、20 nM を越える濃度については同様に置換法を用いた。 [³H]AMPA および (S)- [³H]AMPA 結合実験ではインキュベーションの際に、受容体に対する親和性を上げる目的で 50 mM チオシアン化カリウム (KSCN) をバッファーに添加した (Hall *et al.*, 1992) 。非特異的結合の測定は更に非放射性 2.0 mM L-グルタミン酸を加えて測定を行った。インキュベーション後の遠心により得られた沈渣は氷冷した純水で表面を洗浄した後、10 %ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) を加えて可溶化し、2.5 ml の液体シンチレーションカクテルを加え、3 時間放置した後に液体シンチレーションカウンター (LSC6500; BECKMAN, U.S.A.) で [³H] の放射線活性を測定した。結合定数の算出はスキヤッチャードプロット法で、SP-123 (東京大学薬学部小野秀樹博士作製) および Prism (Graphpad software inc., U.S.A.) の専用コンピュータープログラム を用いて行った。

② 濾過法

濾過法は専用のセルハーベスターを使用して、膜サンプルをガラス繊維濾紙上にトラップして回収する結合実験法で遠心法よりも簡便な方法であり、NMDA 型受容体に対する [³H]MK-801 (NEN, Specific activity 884.3 Gbq/mmol) 結合実験に用いた (Wong *et al.*, 1986) 。P2 膜サンプルを前述の

遠心法と同様に処理した後，この懸濁液に放射性リガンドを加えて室温で 60 分間インキュベーションを行った．放射性リガンドの非特異的吸着を抑制するため，あらかじめ 0.1 % ポリエチレンイミンで処理したガラス繊維濾紙 (GF/B: Watmann) 上にセルハーベスター (Brandel, U.S.A.) を用いて吸引濾過して膜サンプルを回収した．膜サンプルを回収した濾紙は氷冷バッファーで 3 回洗浄した後，液体シンチレーション液中に 24 時間浸し，液体シンチレーションカウンター (LSC6500, Beckman, U.S.A.) で放射活性を測定した．反応させる放射性リガンドの濃度は 2.5 - 20 nM の間に設定した．また，インキュベーションの際に，受容体に対する親和性を上げる目的で 10 μ M L-グルタミン酸および 10 μ M グリシンをアッセイバッファーに添加した (Bénavidès *et al.*, 1988) ．非特異的結合の測定は 500 μ M の非放射性フェンシクリジン (PCP) を加えて行った．結合定数の算出は前述の遠心法と同様に行った．

4. 定量的イムノブロット実験

ラットの大脳皮質全体から作製した P2 膜サンプルもしくは総蛋白質をポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (SDS-PAGE) で泳動した．泳動にあたって膜サンプルを蛋白質分解酵素阻害剤 (1 μ g/ml ロイペプチン, 1 μ g/ml ペプスタチン A, 100 μ g/ml フェニルメチルスルフォニルフロライド) を含む SDS-PAGE サンプルバッファー (25 mM Tris-HCl, 4 % SDS, 10 % グリセロール) 中で超音波破碎機 (Branson, U.S.A.; タイテック, 埼玉) を用いて可溶化したのち，95 $^{\circ}$ C のヒートブロック中で 10 分間蛋白質の熱変性を行った．このそれぞれの検体の可溶化膜サンプル中の蛋白質量を BCA 蛋白質定量キット (Pierce,

U.S.A.) を用いて、ウシ血清アルブミンを標準蛋白質として蛋白質量を測定した。その値から、サンプル中の蛋白質量が一定になるように SDS-PAGE サンプルバッファーによる希釈で調整した。対照群と被検群のサンプルを同量ずつ (10 - 50 μg) , 同一の 7 % アクリルアミドゲル上で同時に泳動した。蛋白質の泳動を行った後、ゲル内の蛋白質をポリビニリデンジフロライド (PVDF) 膜上に電気泳動的に転写した。次に、膜を 50 % メタノール, 10 % 酢酸で洗浄した後、蛋白質をクマシーブリリアントブルーで染色し、各レーンごとの蛋白質量が等量であることを確認した。95 % メタノールで脱色した後、抗体希釈液 (20 mM Tris-HCl pH7.5, 150 mM NaCl, 5 % 脱脂粉乳, 0.01 % Tween 20) 中に室温で 1 時間または 4 $^{\circ}\text{C}$ で一晩ブロッキングを行った。その後、各 AMPA 型受容体に対する抗体を上記抗体希釈液に溶解して室温で 60 分間インキュベーションを行った。本実験で使用した抗体は、ポリクローナル抗体として Anti-GluR1, Anti-GluR2, Anti-GluR2/3, Anti-GluR4, モノクローナル抗体として、Anti-GluR2(4) (いずれも Chemicon Inc., U.S.A.)。Anti-GluR2(4) はイムノブロット法では GluR2 のみを認識する抗体なので、GluR2 特異抗体として用いた。洗浄後 HRP で標識した二次抗体で処理して、ECL 化学発光検出システム (Amersham, U.S.A.) を用いて免疫陽性バンドをフィルム上に焼き付けた。フィルム上の免疫陽性バンド銀粒子密度の計測は、スキャナーによりコンピューター上に取り込んだ精細画像から密度解析プログラム (NIH image Ver. 1.6) を用いて行った。解析結果は、対照群の平均値を 100 % として表した。結果の統計処理においては Welch の t-検定を使用した。

第3章 結果

1. pCPA 7日間投与のイオノトロピック型各受容体発現に対する影響

(大脳皮質中のセロトニン濃度の測定)

セロトニンの合成阻害薬である pCPA を 100 mg/kg 体重 7日間投与したラットの脳皮質においてセロトニン濃度は対照群の 5% 以下に減少していた。また、ノルアドレナリンおよびカテコールアミンの代謝物 (DOPAC) 濃度には変化が無かったことから、セロトニンが特異的に減少している事が示された。また、pCPA 10 mg/ml 投与群においてはセロトニン濃度が対照群の約 87% に減少した (図 1)。詳細な測定値は表 1 に示した。

(放射性リガンド結合実験)

5-100 nM の [³H]AMPA を用いた結合実験では、スキッチャードプロット法で直線回帰により算出した最大結合量 (B_{max}) が、前頭・頭頂・後頭部皮質のいずれにおいても増加していた (図 2)。また、親和性を示す K_d 値に大きな変化は見られなかったことから、この増加が親和性の変化ではなく受容体量の増加によることが示された。また、予備的に行った pCPA 10 mg/kg 体重投与群の最大結合量は対照群と pCPA 100 mg/kg 体重投与群との中間の値を示し、HPLC-ECD による大脳皮質内セロトニン濃度の結果と併せて、この増加が大脳皮質内セロトニン濃度に依存的であることが示唆された。それぞれの

B_{max} 値と K_d 値は図中に示した。

AMPA 型受容体のリガンドに対する結合活性は、高親和性と低親和性の二つの相があり、高親和性と低親和性の受容体が存在していると考えられているため、上記 $[^3H]$ AMPA 結合実験の結果がこの両方に等しく作用しているかどうか検討しなければならない。一般に、低濃度域から高濃度域までの間に広く濃度段階を設定した結合実験では、スキッチャードプロット法で非直線回帰分析を行うことにより両部位の結合定数 (B_{max} 値および K_d 値) をそれぞれに算出することが可能となる。しかし、 $[^3H]$ AMPA については本研究の実験系では使用可能な放射性リガンド量に限界があり、非直線回帰分析に十分な結合が得られなかった。そこで、 $[^3H]$ AMPA の 8 倍の親和性を持つことが報告されている (S)- $[^3H]$ AMPA を用いて結合実験を行った。この実験では、大脳皮質全体から作製した膜標本から低親和性部位と高親和性部位それぞれの発現量に対する大脳皮質セロトニン濃度減少の影響を検討した。

1.5 - 1000 nM の (S)- $[^3H]$ AMPA を用いた結合実験では、スキッチャードプロット法で専用のコンピューターソフトウェア (SP-123 および Graphpad Prism) による非直線回帰により算出した最大結合量 (B_{max}) が、低親和性部位と高親和性部位のいずれにおいても増加していた (図 3)。また、親和性を示す K_d 値も両者とも変化は見られなかった。このことから大脳皮質セロトニンの濃度低下に伴って、機能的 AMPA 型受容体量が増加していることが示された。それぞれの B_{max} 値と K_d 値は図中に示した。

5-100 nM の $[^3H]$ カイニン酸 を用いた結合実験では、スキッチャードプロット法で直線回帰により算出した最大結合量 (B_{max}) が、前頭・頭頂・後

頭部皮質のいずれにおいても減少していた（図 4）。また、親和性を示す K_d 値に大きな変化は見られなかったことから、この増加が親和性の変化ではなく受容体量の減少によることが示された。それぞれの B_{max} 値と K_d 値は図中に示した。予備的に行った pCPA 10 mg/kg 体重 投与群の最大結合量は対照群と pCPA 100 mg/kg 体重 投与群との中間の値を示し、HPLC-ECD による大脳皮質内セロトニン濃度の結果と併せて、この減少が大脳皮質内セロトニン濃度に依存的であることが示唆された。カイニン酸型受容体のリガンドに対する結合活性においても、高親和性部位と低親和性部位の受容体が存在していると考えられている。しかし、 $[^3H]$ カイニン酸は受容体に対する親和性が比較的 low 本研究で用いた実験系においては使用可能な放射性リガンドの量に限界があり、非直線回帰分析に十分な結合が得られなかった。また、カイニン酸型受容体には未だ高親和性の特異的リガンドが開発されていないことや、その役割が未だ明瞭ではないため、低親和性部位と高親和性部位それぞれに対する検討は行わなかった。

2.5 - 20 nM の $[^3H]$ MK-801 を用いた NMDA 型受容体に対する結合実験では、スキャッチャードプロット法で直線回帰により算出した最大結合量 (B_{max}) が、前頭・頭頂・後頭部皮質のいずれにおいても変化がみられなかった（図 5）。また、親和性を示す K_d 値にも変化が見られなかった。このことから、NMDA 型受容体発現量は大脳皮質内セロトニン濃度に影響されない可能性が示唆された。それぞれの B_{max} 値と K_d 値は図中に示した。

2. 増加を示す AMPA 型受容体サブタイプの特異性：定量的イムノブロット実験

放射性リガンド結合実験の結果を受けて、大脳皮質セロトニン濃度減少による AMPA 型受容体増加の主体となっている受容体サブタイプを特定するため、サブタイプ特異抗体を用いた定量的イムノブロット実験を行った。

まず、放射性リガンド結合実験と同様の P2 膜サンプルの可溶化蛋白質を用いて、AMPA 型受容体のサブタイプ特異抗体による実験を行った。このうち、GluR3 サブタイプについては特異抗体が入手できないので、GluR2/3 交差抗体を用いた (図 6A)。GluR1 サブタイプでは発現量の減少傾向がみられ ($76.61 \pm 7.88 \%$)、GluR2(4) ($123.02 \pm 5.32 \%$) と GluR2/3 ($125.96 \pm 2.09 \%$) サブタイプでは増加傾向がみられた (図 6B)。GluR2(4) と GluR2/3 の増加程度が同様であったことから、この増加の主体は GluR2 サブタイプの増加が主体であることが示唆された。GluR4 サブタイプについては、発現が小脳で非常に高く、大脳皮質ではごく低いことが報告されている。本実験において GluR4 の免疫反応はごく微弱であったため有効な発現量計測ができなかった。

次に、P2 膜標本は作成段階で遠心操作を行うため、膜蛋白質の欠失が起こり正確な測定が行われない可能性がある。そこで、GluR2(4) および GluR2/3 については摘出した大脳皮質を直接サンプルバッファー中でホモジェナイズして作製した可溶化蛋白質を用いて検討した。その結果、P2 膜標本を用いたものと同様の増加傾向が確認された (図 6C)。GluR2(4) と GluR2/3 密度の増加程度も同様であった。このことから P2 膜標本を用いた実験での測定の有効性が示された。

3. 5-HT_{2A} 型セロトニン受容体の AMPA 型受容体 GluR2 サブタイプに対する影響

5-HT_{2A} 受容体がグルタミン酸作動性と考えられる大脳皮質非対称性シナプスの後シナプス肥厚部の直下に局在する事から、セロトニンが 5-HT_{2A} 受容体を介して AMPA 型グルタミン酸受容体サブタイプ組成を調節している可能性が考えられる。そこで、5-HT_{2A} 受容体の選択的アンタゴニストのケタンセリンを投与した動物群、pCPA 投与群および対照群について、定量的イムノブロット実験により GluR2 受容体発現量を検討した。

まず、投薬期間をこれまでの実験と同様に 7 日間として実験を行った。GluR2/3 交差抗体を用いて単一免疫陽性バンド (図 7A) を計測した結果、pCPA 投与群 (125.96 ± 2.09 %) とケタンセリン投与群 (112.84 ± 3.52 %) の両方に免疫反応の増加が見られた (図 7B)。

次に、各薬物の投与期間を 4 日間に短縮した動物を作成したところ、各群における大脳皮質中のセロトニン濃度は 7 日間投与した動物と同様に pCPA 100 mg/kg 投与群では対照群に対して約 7 % に減少していた (図 8)。そこで、各薬物を 4 日間投与した動物についてポリクローナルの GluR2 受容体特異抗体を用いて単一免疫陽性バンド (図 9A) を計測した結果、pCPA 投与群 (133.86 ± 6.01 %) とケタンセリン投与群 (128.19 ± 2.43 %) の両方に同等の免疫反応の増加が見られた (図 9B)。ケタンセリン 10 mg/kg 投与群では対照群と比較して大脳皮質中のセロトニン濃度に有意な変化は無く、ケタンセリン 10 mg/kg 投与はセロトニン濃度に影響していなかった (図 8)。詳細な測定値は表 2 に示した。

第4章 考察

1. 薬物投与の影響

本実験では大脳皮質のセロトニン濃度を減少させるためにセロトニンの合成阻害薬である pCPA 100 mg/kg・体重 を用いた。この薬物は以前より脳内セロトニン濃度を選択的に減少させる目的で用いられており (Koe and Weissman, 1966), 今回使用した投与量が有効に大脳皮質内のセロトニン濃度を減少させ、その他のモノアミン濃度に影響を与えていないことは HPLC-ECD を用いた測定で確認された。

また、5-HT_{2A} 受容体の選択的阻害剤として、ケタンセリン 10 mg/kg を用いた。この薬物は以前よりもっとも選択性の高い 5-HT_{2A} 受容体阻害剤として用いられている (Hoyer *et al*, 1994)。今回使用した投与量は受容体に対する阻害効果を確実に見るため、若干高い用量を用いた。そのため、5-HT_{2C} 受容体にも阻害効果が現れている可能性がある (Sanders-Bush *et al*, 1988)。

2. 大脳皮質における各型グルタミン酸受容体密度変化の部位特異性

イオノトロピック型グルタミン酸受容体の 3 つの型に対する特異的放射性リガンド結合実験では、まず、大脳皮質を前頭部皮質・頭頂部皮質・後頭部皮質の 3 部位に分けて検討を行った。これは、各大脳皮質の部位を連合野、体性感

覚および運動野，そして視覚野というおおまかな区分としてとらえ，それぞれ個別の調節効果があるか検討するためである．結果として，AMPA 型・カイン酸型・NMDA 型受容体に部位による差は認められなかった．このことは，大脳皮質のイオノトロピック型グルタミン酸受容体の発現にセロトニンは一様の効果を持つことを示唆している．

3. AMPA 型グルタミン酸受容体発現に対する影響

① pCPA による大脳皮質セロトニン濃度減少の各イオノトロピック型グルタミン酸受容体に対する影響

スキッチャードプロット法を用いた直線回帰分析により，大脳皮質の 3 部位において同様に， $[^3\text{H}]\text{AMPA}$ の最大結合量 (B_{max}) が増加傾向を示した．リガンドの受容体に対する親和性を示す解離定数 (K_d) には変化が見られなかったため，大脳皮質セロトニン濃度の低下に伴う AMPA 型受容体量の増加が示された．

$[^3\text{H}]\text{AMPA}$ のスキッチャードプロットは以前より高親和性部位と低親和性部位の二相性を示すことが知られており (Monaghan *et al.*, 1989)，それぞれの B_{max} と K_d を求めるためには非直線回帰分析を行わなければならない．しかし，本実験を開始した時点での目的は AMPA 型受容体総量の変化をとらえることであったため，直線回帰分析による解析で総量の変化を検討した．その背景にはモノアミンと受容体の結合に比べ，AMPA の受容体に対する親和性は非常に低く，非直線回帰を行うには非常に高濃度の放射性リガンドを必要とし，そのような実験を複数回行うことが困難である事情があった．

ところが、 $[^3\text{H}]\text{AMPA}$ の 8 倍の親和性を持つ選択的リガンドの (S)- $[^3\text{H}]\text{AMPA}$ が利用可能になり、本実験の後半では高親和性部位と低親和性部位それぞれの変化を非直線回帰により解析した (Hawkins *et al.*, 1995) . $[^3\text{H}]\text{AMPA}$ 結合実験の結果が脳皮質で部位差がない事が明らかになったため、脳皮質全体を用いて実験を行い、高親和性と低親和性の両部位において同程度の B_{max} 値の増加が観察された。また、 K_d 値は変化しなかったため、脳皮質セロトニン濃度の低下に伴って AMPA 型受容体の高親和性および低親和性の両方の部位がともに同程度に増加したことが示された。

② セロトニン濃度の減少によって影響を受ける受容体サブタイプの同定

(実験方法に対する検討)

定量的イムノブロット実験においては各実験群において測定された蛋白質量の一定性が重要である。本実験においては、膜サンプル作製の最終段階で各個体のサンプル中の蛋白質量を統一し、さらにクマシーブリリアントブルー染色で転写された各サンプルのタンパク質濃度に差がないことを確認した。また、密度変化の評価に関しても、被検群と対照群の各個体のサンプルを全て同じゲルで同時に処理することにより実験操作による誤差を最大限排除するようにつとめた。また、評価に用いた蛋白質濃度と異なる濃度のサンプルでも同様の結果が示されたので、サンプル間の免疫反応が平行となる蛋白質濃度で評価したことが確認された。これらのことから本研究で行った定量的イムノブロット実験の結果の信頼性は高いものと考えられる。

(発現量に変化する主要な受容体)

本実験において GluR2 受容体の増加とともに GluR1 受容体の減少が示された。放射性リガンド結合実験の結果は AMPA 型受容体の増加を示しているが、これまでにラットの大脳皮質に発現する GluR2 受容体量は GluR1 受容体の 4 倍という報告があり (Bahr *et al.*, 1996), AMPA 型受容体の総量の増加には GluR2 の増加を反映している。GluR3 受容体については直接的な結果は得られなかったが、GluR2 抗体と GluR2/3 交差抗体を用いた実験が同様の結果を示したため、GluR3 受容体量大きく変化していないと考えられる。GluR4 受容体の発現は小脳に限局することが知られ、大脳皮質での発現量は僅少である (Keinännen *et al.*, 1990; Sato *et al.*, 1993)。本実験では極めて高濃度の抗体 (50 倍) を反応させても非常に希薄な免疫陽性バンドしか得られなかったため、発現量計測に不十分であった。この結果から、AMPA 受容体総量の変化における GluR4 の関与は極めて小さいと考えられる。従って、大脳皮質セロトニンの濃度低下に伴った AMPA 型受容体の増加は主に GluR2 受容体の増加による事が示された。

③ GluR2 発現調節に関与するセロトニン受容体の同定

これまでに、セロトニンが中枢神経系においてシナプス数を調節するという報告があり、この現象は 5-HT_{2A} 受容体が主体となって関与していることが明らかになっている (Niitsu *et al.*, 1995)。このことは中枢神経系での神経伝達の調節機構に 5-HT_{2A} 受容体が深く関わっている事を示唆している。また、5-HT_{2A} 受容体特異抗体を用いた免疫組織化学的研究では、サルとラットの大脳皮

質にある錐体細胞の多くがこの受容体を発現し、非対称性シナプスの後シナプス膜肥厚部に局在することが報告されている (Hamada *et al.*, 1998; Jakab and Goldman-Rakic, 1998) . このことは 5-HT_{2A} 受容体と GluR2 受容体が同じ後シナプス膜肥厚部に共存していることを強く示唆している. これらのことから, 次に大脳皮質セロトニン濃度の減少に伴って起こる GluR2 受容体発現量の増加に対する 5-HT_{2A} 受容体の役割を検討した.

ラットに選択的アンタゴニストであるケタンセリンを投与することによって 5-HT_{2A} 受容体を阻害した結果, GluR2/3 抗体の免疫反応が pCPA を投与した群と同様な増加傾向を示した. 薬物投与期間を 4 日間に短縮した実験でも pCPA 投与群とケタンセリン投与群の GluR2 抗体の免疫反応は同様の増加傾向を示し, 大脳皮質セロトニン濃度の減少に伴う GluR2 発現量の増加に 5-HT_{2A} 受容体が関わっている事が示された.

④ 5-HT_{2A} 受容体による GluR2 受容体発現調節の意義

従来 AMPA 型受容体には Ca²⁺ 透過性がないと考えられてきたが, その原因が GluR2 受容体にあることが明らかにされた (Hollmann *et al.*, 1991; Verdoorn *et al.*, 1991) . GluR2 受容体は立体構造でイオノフォアを形成する部分に極性アミノ酸分子が配置されるように RNA エディティングが起こり, 2 価の陽イオンの透過を阻害する (Sommer *et al.*, 1990; Higuchi *et al.*, 1993) . これに対して他の 3 つのサブタイプは 2 価の陽イオンの透過を阻害しないため, GluR2 を含まない AMPA 型受容体チャンネルは Ca²⁺ を透過させると考えられている (Pellegrini-Giampietro *et al.*, 1997) . この RNA エディティングは出

生以後では全ての GluR2 の mRNA に起こることが報告されており，本研究で増加が確認された GluR2 は全て Ca^{2+} 透過性を阻害する性質があると考えられる (Hollmann and Heinemann, 1994).

また，GluR2 の発現をなくしたミュータントマウスの研究では NMDA 型受容体の阻害下でも著しい Ca^{2+} の細胞内流入が報告されている (Jia *et al.*, 1996) . また，NMDA 型受容体非依存性の LTP がこのミュータントマウスにみられた (Turner *et al.*, 1982; Jia, *et al.*, 1996) . また，このミュータントマウスは幼若期に死亡することが報告されている (Jia *et al.*, 1996) . 以上のことから GluR2 受容体が細胞内への Ca^{2+} 流入に対して果たす役割が大きいことが推察される.

このような性質から GluR2 は神経細胞に対する内因性グルタミン酸による神経毒性発現の「分子的スイッチ」になっていると考えられている. 実験的に脳虚血状態にしたラットの海馬で神経細胞死が起こり (Héron *et al.*, 1993; Nitatori *et al.*, 1995) , これに伴う GluR2 の mRNA の顕著な減少が報告されている (Pellegrini-Giampietro *et al.*, 1992) . また，実験的に痙攣重積状態にしたラットの海馬でも神経細胞死と AMPA 型受容体の mRNA 発現量の変化が報告されている (Dragunow *et al.*, 1995a; Mathern *et al.*, 1998) . この神経細胞死の原因が， Ca^{++} 透過型 AMPA 受容体を介した神経細胞内への過度の Ca^{++} 流入にあるとした「GluR2 仮説」が提唱されている. 「GluR2 仮説」は脳虚血やてんかんばかりではなく，アルツハイマー氏型痴呆やハンチントン氏病などの神経細胞死が見られる疾患で (Dragunow *et al.*, 1995b) , GluR2 発現量減少に起因する神経細胞への過度の Ca^{++} 流入が起こっており，病態の発

現に関与していることを示唆している (Pellegrini-Giampietro *et al.*, 1997). セロトニンはアルツハイマー氏型痴呆など様々な神経疾患への関与が知られており (Sandyk, 1992), その病態発現にセロトニンによる GluR2 の発現調節機構が関与しているかもしれない.

本実験の結果から, 5-HT_{2A} 受容体を介したセロトニン刺激の阻害に伴って GluR2 が増加する事が明らかになった. 放射性リガンド結合実験の結果は AMPA 型受容体総量の増加による AMPA 型受容体を介する伝達の増強を示唆する. 一方, 定量的イムノブロット法の結果が示す Ca²⁺ を透過させる GluR1 の減少と, Ca²⁺ 透過を阻害する GluR2 の増加は AMPA 型受容体チャンネル構成の変化に伴う細胞内への Ca²⁺ 流入の減少を推測させる. このように本実験は大脳皮質においてセロトニン濃度が増加すると, シナプス後部にある AMPA 型受容体発現量が増加して興奮性神経伝達が調節されることを示唆している.

また, 興奮性シナプス後部における AMPA 型受容体と 5-HT_{2A} 受容体の共存を基にして, セロトニンによる興奮性神経伝達の調節に関して一つのモデルが考えられる. 図 10 のように興奮性シナプスに存在する 5-HT_{2A} 受容体はそこから離れた神経線維から放出されたセロトニンに対して反応し, その結果 AMPA 型グルタミン酸受容体の発現が調節されるというものである. AMPA 型グルタミン酸受容体は NMDA 型受容体と協働し, 興奮性神経伝達の効率を変化させる. セロトニンはこのような機構を通して脳内濃度が 1000 倍も高いグルタミン酸による神経伝達に影響し, 間接的に高次神経機能を調節しているのではないかと考えられる.

4. カイニン酸型受容体発現に対する影響

スキッチャードプロット法を用いた直線回帰分析により、大脳皮質においては部位差が無く、 $[^3\text{H}]$ カイニン酸の最大結合量が減少傾向を示した。リガンドの受容体に対する親和性には変化が見られなかった。従って、大脳皮質セロトニン濃度の低下に伴ってカイニン酸型受容体量が減少する事が示された。

$[^3\text{H}]$ カイニン酸のスキッチャードプロットも高親和性部位と低親和性部位の二相性を示すことが知られている (Monaghan *et al.*, 1989)。このためには非直線回帰を行わなければならないが、 $[^3\text{H}]$ カイニン酸の受容体に対する親和性が極めて低いことや高親和性の特異的放射性リガンドが利用できない (Dingledine *et al.*, 1999) ことなどの理由により、非直線回帰による分析は行わなかった。本実験での直線回帰分析による結果は、カイニン酸型受容体総量の変化を示していると考えられる。

これまでにカイニン酸型受容体について、免疫組織化学的研究や *in situ* ハイブリダイゼーション法により脳内分布が調べられている (Monaghan *et al.*, 1989; Hollmann and Heinemann, 1994)。この受容体は他のイオノトロピック型グルタミン酸受容体と同様に中枢神経系全体に広く発現しているが、シナプス前終末部にも発現するという特徴がある (Petralia *et al.*, 1994)。最近、AMPA 受容体の特異阻害薬が開発され、NMDA 型と AMPA 型受容体の阻害下にカイニン酸型受容体活性だけを維持した興奮性伝達の実験が可能になった (Vignes and Collingridge, 1997)。この実験系を用いて海馬においてカイニン酸型受容体の活性化が神経終末からのグルタミン酸放出を抑制するということが報告された (Cossart *et al.*, 1998)。この現象を大脳皮質に適用すると、

本実験の結果からセロトニン濃度の低下は興奮性神経終末からのグルタミン酸放出抑制の解除に働く可能性が考えられる。しかし、カイニン酸型受容体の働きは未だ不明な点が多く今後さらに検討していくべき課題である。

5. NMDA 型受容体発現に対する影響

NMDA 型受容体には、グルタミン酸以外の結合部位が知られている。MK-801 はフェンシクリジン (PCP) の特異結合部位に高い親和性を示す非競合的アンタゴニストである (Wong *et al.*, 1986)。スキッチャードプロット法を用いた直線回帰分析により、大脳皮質の 3 部位において同様に、 $[^3\text{H}]$ MK-801 の最大結合量と親和性には変化が見られなかった。MK-801 の結合部位は親和性が単一でスキッチャードプロットは直線を示すことが知られている。本実験の結果は単一親和性の結合部位のみを認識した。

本実験の結果から、大脳皮質セロトニン濃度の低下に伴うイオノトロピック型グルタミン酸受容体発現量の変化は non-NMDA 型受容体が主体となることが示唆された。

第5章 結論

・本研究により以下のことが明らかとなった。

セロトニンの合成阻害剤 pCPA 100 mg/kg 体重 を 7 日間投与したラットにおいて、大脳皮質のセロトニン濃度は 5 % 以下に減少し、それに伴い、機能的 AMPA 型グルタミン酸受容体密度の増加とカイニン酸型受容体密度の減少が観察された。NMDA 型受容体密度に変化は見られなかった。

このうち、AMPA 型受容体密度の増加は AMPA 型受容体の Ca^{2+} 透過性を調節する GluR2 受容体の増加によるものであった。

また、このセロトニン濃度の低下による GluR2 受容体の増加現象は 5-HT_{2A} 型セロトニン受容体を介したものであった。

・また、本研究から以下の可能性が示唆される。

広範投射系であるセロトニン作動性神経は、限局投射系であるグルタミン酸作動性興奮性神経伝達に対して、イオノトロピック型グルタミン酸受容体の構成を変化させることにより伝達効率を調節し、神経伝達の可塑的現象や高次神経機能の発現に関与している。

謝辞

本研究を行うにあたりご指導頂きました指導教官の筑波大学基礎医学系 岡戸信男教授に心より御礼申し上げます。

本研究を行うにあたっての討議および実験に関するご助言を頂きました筑波大学基礎医学系 濱田俊講師に心より御礼申し上げます。

本研究にご助言を頂きました筑波大学基礎医学系 志賀隆助教授に心より御礼申し上げます。

本研究に対するご助言および pCPA 投与による GluR2 増加説に対してその mRNA の増加データの付加によりご支援下さいました筑波大学基礎医学系 成田正明講師に心より御礼申し上げます。

本研究に対して神経細胞培養法による解析をご指導下さいました東京都精神医学総合研究所 山本秀子博士に厚く御礼申し上げます。

実験に関するご助言を頂きました筑波大学基礎医学系解剖学グループの諸先生方に厚く御礼申し上げます。

[³H]MK-801 結合実験およびその他の放射性リガンド結合実験にご便宜下さいました筑波大学臨床医学系 鈴木利人助教授ならびに精神薬理学グループの諸先生方に厚く御礼申し上げます。

最後に、[³H]MK-801 結合実験にあたってご協力頂きました筑波大学大学院修士課程医科学研究科平成 10 年修了の柴田路代氏に深く感謝します。

文献

- Bahr B. A., Hoffman K. B., Kessler M., Hennegriff M., Park G. Y., Yamamoto R. S., Kawasaki B. T., Vanderklish P. W., Hall R. A. and Lynch G. (1996) Distinct distribution of α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionate (AMPA) receptor subunits and a related 53,000 M_R antigen (*GR53*) in brain tissue. *Neuroscience* 74: 707-721.
- Beaumont K., Maurin Y., Reisine D., Fields J. Z., Spokes E., Bird E. D. and Yamamura H. I. (1979) Huntington's disease and its animal model: alterations in kainic acid binding. *Life Sci.* 24: 809-816.
- Bénavidès J., Rivy J. P., Carter C. and Scatton B. (1988) Differential modulation of [³H]TCP binding to NMDA receptor by L-glutamate and glycine. *Eur. J. Pharmacol.* 149: 67-72.
- Bochet P., Audinat E., Lambolez B., Crepel F., Rossier J., Iino M., Tsuzuki K. and Ozawa S. (1994) Subunit composition at the single-cell level explains functional properties of a glutamate-gated channel. *Neuron* 12: 383-388.
- Carlsson A. (1987) Perspectives on the discovery of central monoaminergic neurotransmission. *Annu. Rev. Neurosci.* 10: 19-40.
- Chen L., Hamaguchi K., Ogawa M., Hamada S. and Okado N. (1994) PCPA reduces both monoaminergic afferents and nonmonoaminergic synapses in the cerebral cortex. *Neurosci. Res.* 19: 111-115.
- Chen L., Hamaguchi K., Hamada S. and Okado N. (1997) Regional

- Differences of serotonin-mediated synaptic plasticity in the chicken spinal cord with development and aging. *J. Neural Transplant. Plast.* 6: 41-48.
- Cossart R., Esclapez M., Hirsch J. C., Bernard C. and Ben-Ari Y. (1998) GluR5 kainate receptor activation in interneurons increases tonic inhibition of pyramidal cells. *Nat. Neurosci.* 1: 470-478.
- Dingledine R., Borges K., Bowie D. and Traynelis S. F. (1999) The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol. Rev.* 51: 7-61.
- Dragunow M., Preston K., Dodd J., Young D., Lawlor P. and Christie D. (1995a) Clusterin accumulates in dying neurons following status epilepticus. *Mol. Brain Res.* 32: 279-290.
- Dragunow M., Faull R. L., Lawlor P., Beilharz E. J., Singleton K., Walker E. B. and Mee E. (1995b) *In situ* evidence for DNA fragmentation in Huntington's disease striatum and Alzheimer's disease temporal lobes. *Neuroreport* 9: 1053-1057.
- Eaton S. A. and Salt T. E. (1989) Modulatory effects of serotonin on excitatory amino acid responses and sensory synaptic transmission in the ventrobasal thalamus. *Neuroscience* 33: 285-292.
- Fuxe K. and Ungerstedt U. (1968) Histochemical studies on the distribution of catecholamines and 5-hydroxytryptamine after intraventricular injections. *Histochemie* 13: 16-28.
- Hall R. A., Massicotte G., Kessler M., Baudry M. and Lynch G. (1992) Thiocyanate equally increase affinity for two DL- α -amino-3-hydroxy-5-

- methylisoxazolepropionic acid (AMPA) receptor states. *Mol. Pharmacol.* 43: 459-464.
- Hamada S., Senzaki K., Hamaguchi-Hamada K., Tabuchi K., Yamamoto H., Yamamoto T., Yoshikawa S., Okano H. and Okado N. (1998) Localization of 5-HT_{2A} receptor in rat cerebral cortex and olfactory system revealed by immunohistochemistry using two antibodies raised in rabbit and chicken. *Mol. Brain Res.* 54: 199-211.
- Hawkins L. M., Beaver K. M., Jane D. E., Taylor P. M., Sunter D. C. and Roberts P. J. (1995) Binding of the new radioligand (S)-[³H]AMPA to rat brain synaptic membranes: effects of a series of structural analogues of the non-NMDA receptor agonist willardiine. *Neuropharmacology* 34: 405-410.
- Hayashi A., Nagaoka M., Yamada K., Ichitani Y., Yoshiaki M. and Okado N. (1998) Maternal stress induces synaptic loss and developmental disabilities of offspring. *Int. J. Dev. Neurosci.* 16: 209-216.
- Héron A., Pollard H., Dessi F., Moreau J., Lasbennes F., Ben-Ari Y. and Charriaud-Marlangue C. (1993) Regional variability in DNA fragmentation after global ischemia evidenced by combined histological and gel electrophoresis observations in the rat brain. *J. Neurochem.* 61: 1973-1976.
- Higuchi M., Single F. N., Köhler M., Sommer B., Sprengel R. and Seeburg P. H. (1993) RNA editing of AMPA receptor subunit GluR-B: a base-paired intron-exon structure determines position and efficiency. *Cell* 75: 1361-

1370.

- Hollmann M., Hartley M. and Heinemann S. (1991) Ca²⁺ permeability of KA-AMPA – gated glutamate receptor channels depends on subunit composition. *Science* 252: 851-853.
- Hollmann M. and Heinemann S. (1994) Cloned glutamate receptors. *Annu. Rev. Neurosci.* 17: 31-108.
- Hoyer D., Clarke D. E., Fozard J. R., Hartig P. R., Martin G. R., Mylecharane E. J., Saxena P. R. and Humphrey P. P. A. (1994) International union of pharmacology classification of receptors for 5-Hydroxytryptamine (Serotonin). *Pharmacol. Rev.* 46: 157-203.
- Iino M., Mochizuki S. and Ozawa S. (1994) Relation between calcium permeability and rectification properties of AMPA receptors in cultured rat hippocampal neurons. *Neurosci. Lett.* 173: 14-16.
- Jacobs B. J. and Azmitia E. C. (1992) Structure and function of the brain serotonin system. *Physiol. Rev.* 72: 165-229.
- Jakab R. L. and Goldman-Rakic P. S. (1998) 5-Hydroxytryptamine_{2A} serotonin receptors in the primate cerebral cortex: possible site of action of hallucinogenic and antipsychotic drugs in pyramidal cell apical dendrites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95: 735-740.
- Jia Z., Agopyan N., Miu P., Xiong Z., Henderson J., Gerlai R., Taverna F. A., Velumian A., MacDonald J., Carlen P., Abramow-Newerly W. and Roder J. (1996) Enhanced LTP in mice deficient in the AMPA receptor GluR2. *Neuron* 17: 945-956.

- Keinänen K., Wisden W., Sommer B., Werner P., Herb A., Verdoorn T. A., Sakmann B. and Seeburg P.H. (1990) A family of AMPA-selective glutamate receptors. *Science* 249: 556-560.
- Koe B. K. and Weissman A. (1966) p-Chlorophenylalanine: a specific depletor of brain serotonin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 154: 499-516.
- Kojima T., Homma S., Sako H., Shimizu I., Okada A. and Okado N. (1988) Developmental changes in density and distribution of serotonergic fibers in the chick spinal cord. *J. Comp. Neurol.* 267: 580-589.
- Lee M., Strahlendorf J. C. and Strahlendorf H. K. (1986) Modulatory action of serotonin on glutamate-induced excitation of cerebellar purkinje cells. *Brain Res.* 361: 107-113.
- Mathern G. W., Pretorius J. K., Leite J. P., Kornblum H. I., Mendoza D., Lozada A. and Bertram. E. H. 3rd (1998) Hippocampal AMPA and NMDA mRNA levels and subunit immunoreactivity in human temporal lobe epilepsy patients and a rodent model of chronic mesial limbic epilepsy. *Epilepsy Res.* 32: 154-171.
- Matsuyama S., Nei K. and Tanaka C. (1997) Regulation of glutamate release via NMDA and 5-HT_{1A} receptors in guinea pig dentate gyrus. *Brain Res.* 761: 105-112.
- Maura G. and Raiteri M. (1996) Serotonin 5-HT_{1D} and 5-HT_{1A} receptors respectively mediate inhibition of glutamate release and inhibition of cyclic GMP production in rat cerebellum *in vitro*. *J. Neurochem.* 66: 203-209.

- McKinney R. A., Capogna M., Dürr R., Gähwiler B. H. and Thompson S. M. (1999) Miniature synaptic events maintain dendritic spines via AMPA receptor activation. *Nat. Neurosci.* 2: 44-49.
- Mennini T. and Miari A. (1991) Modulation of [³H]-glutamate binding by serotonin in the rat hippocampus: an autoradiographic study. *Life Sci.* 49: 283-292.
- Monaghan D. T., Bridges R. J. and Cotman C. W. (1989) The excitatory amino acid receptors: their classes, pharmacology, and distinct properties in the function of the central nervous system. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 29: 365-402.
- Nicholls D. G. (1994) Chapter 3: Ions and membrane potentials. *Proteins, Transmitters and Synapses*, Blackwell Science, London, 26-38.
- Niitsu Y., Hamada S., Hamaguchi K., Mikuni M. and Okado N. (1995) Regulation of synapse density by 5-HT_{2A} receptor agonist and antagonist in the spinal cord of chicken embryo. *Neurosci. Lett.* 195: 159-162.
- Nitatori T., Sato N., Waguri S., Karasawa Y., Araki H., Shibanaï K., Kominami E. and Uchiyama Y. Delayed neuronal death in the CA1 pyramidal cell layer of the gerbil hippocampus following transient ischemia is apoptosis. (1995) *J. Neurosci.* 15: 1001-1011.
- Nowark L. M., Bregestovski P., Ascher P., Herbet A. and Prochiantz A. (1984) Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurons. *Nature* 307: 462-465.

- Okado N., Cheng L., Tanatsugu Y., Hamada S. and Hamaguchi K. (1993) Synaptic loss following removal of serotonergic fibers in newly hatched and adult chickens. *J. Neurobiol.* 24: 687-698.
- Olsen R. W., and Szamraj O. and Houser C. R. (1987) [³H]AMPA binding to glutamate receptor subpopulations in rat brain. *Brain Res.* 402: 243-254.
- Ozaki S., Kudo N. and Okado N. (1991) Serotonin-positive fibers within the spinal motor nucleus of the newborn rat, with special reference to co-localization of substance P. *Neurosci. Lett.* 130: 145-148.
- Pellegrini-Giampietro D. E., Zukin R. S., Bennett M. V., Cho S. and Pulsinelli W. A. (1993) Switch in glutamate receptor subunit gene expression in CA1 subfield of hippocampus following global ischemia in rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89: 10499-10503.
- Pellegrini-Giampietro D. E., Gorter J. A., Bennett M. V. and Zukin R. S. (1997) The GluR2 (GluR-B) hypothesis: Ca²⁺-permeable AMPA receptors in neurological disorders. *Trends Neurosci.* 20: 464-70.
- Petralia R. S., Wang Y. X. and Wenthold R. J. (1994) Histological and ultrastructural localization of the kainate receptor subunits, KA2 and GluR6/7, in the rat nervous system using selective antipeptide antibodies. *J. Comp. Neurol.* 349: 85-110.
- Reynolds J. N., Baskys A. and Carlen P. L. (1988) The effects of serotonin on N-methyl-D-aspartate and synaptically evoked depolarizations in rat neocortical neurons. *Brain Res.* 456: 286-292.
- Sanders-Bush E. and Breeding M. (1988) Putative selective 5-HT₂

- antagonists block serotonin 5-HT_{1C} receptors in the choroid plexus. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 247: 169-173.
- Sandyk R. (1992) L-tryptophan in neuropsychiatric disorders: a review. *Int. J. Neurosci.* 67: 127-144.
- Sato K., Kiyama H. and Tohyama M. (1993) The differential expression patterns of messenger RNAs encoding non-*N*-methyl-D-aspartate glutamate receptor subunits (GluR 1-4) in the rat brain. *Neuroscience* 52: 515-539.
- Schmitz D., Empson R. M. and Heinemann U. (1995) Serotonin and 8-OH-DPAT reduce excitatory transmission in rat hippocampal area CA1 via reduction in presumed presynaptic Ca²⁺ entry. *Brain Res.* 701: 249-254.
- Shupliakov O., Pieribone V. A., Gad H. and Brodin L. (1995) Synaptic vesicle depletion in reticulospinal axons is reduced by 5-hydroxytryptamine: direct evidence for presynaptic modulation of glutamatergic transmission. *Eur. J. Neurosci.* 7: 1111-1116.
- Turner R. W., Baimbridge K. G. and Miller J. J. (1982) Calcium-induced long-term potentiation in the hippocampus. *Neuroscience* 7: 1411-1416.
- Twarog B. M. and Page I. H. (1953) Serotonin content some mammalian tissues and urine and a method for its determination. *Am. J. Physiol.* 175: 157-161.
- Verdoon T. A., Burnashev N., Monyer H., Seeburg P. H. and Sakmann B. Structural determinants of ion flow through recombinant glutamate receptor channels. *Science* 252: 1715-1718.

Vignes M. and Collingridge G. L. (1997) The synaptic activation of kainate receptors, *Nature* 388: 179-182.

Wong E. H. F., Kemp J. A., Priestley T., Knight A. R., Woodruff G. N. and Iversen L. L. (1986) The anticonvulsant MK-801 is a potent *N*-methyl-D-aspartate antagonist. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83: 7104-7108.

付図・表

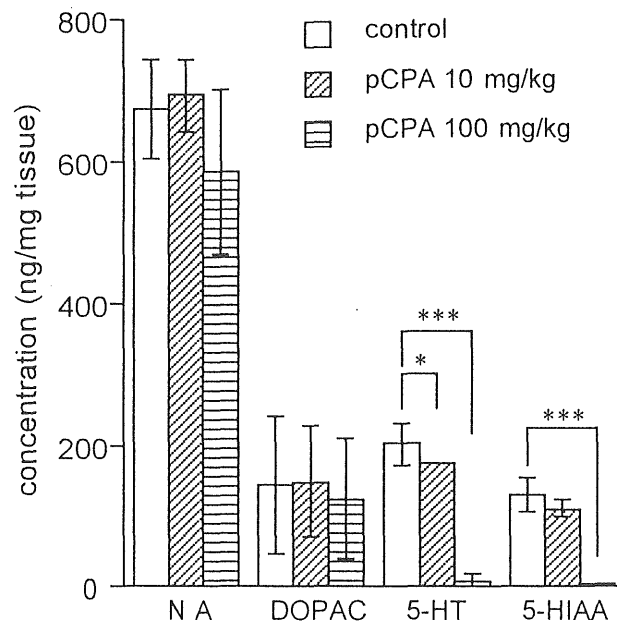


図 1. pCPA 投与 7 日後の被検群と対照群 (control) のセロトニン (5-HT) とその代謝物 5-ヒドロキシインドール酢酸 (5-HIAA), およびノルアドレナリン (NA) とカテコールアミン代謝物 3,4-ジヒドロキシフェニル酢酸 (DOPAC) の大脳皮質内濃度. 平均値 \pm s.d., $n = 6$, * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

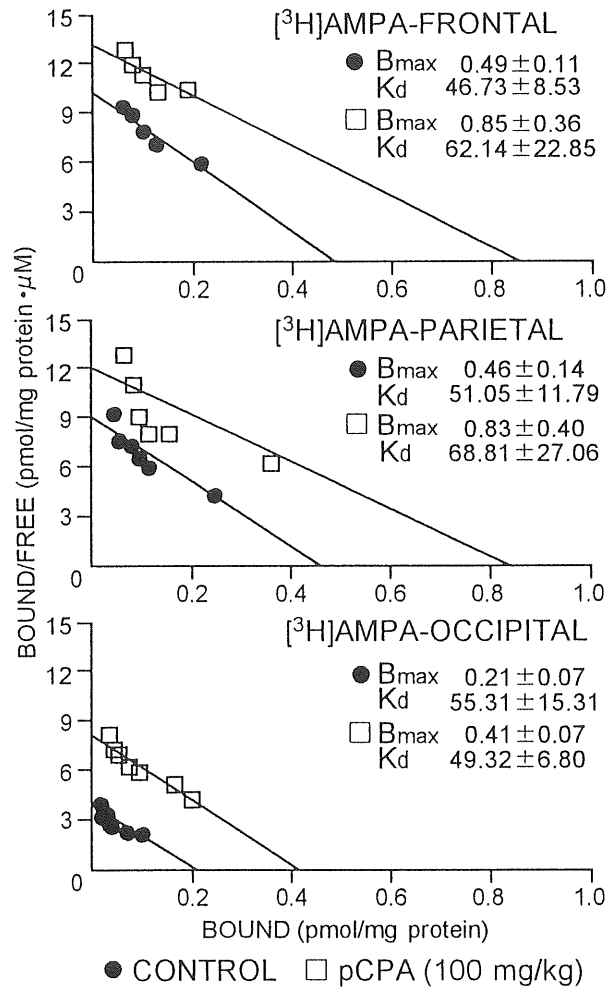


図 2. pCPA (100 mg/kg・体重) 投与群と対照群 (control) の大脳皮質前頭部, 頭頂部, 後頭部から作成した粗シナプス膜分画に対する $[^3\text{H}]\text{AMPA}$ 結合実験のスキッチャードプロット. 図内にそれぞれの B_{max} 値 (平均値 \pm s.d. (pmol/mg・protein)) および K_d 値 (平均値 \pm s.d. (nM)) を示す. $n = 3$.

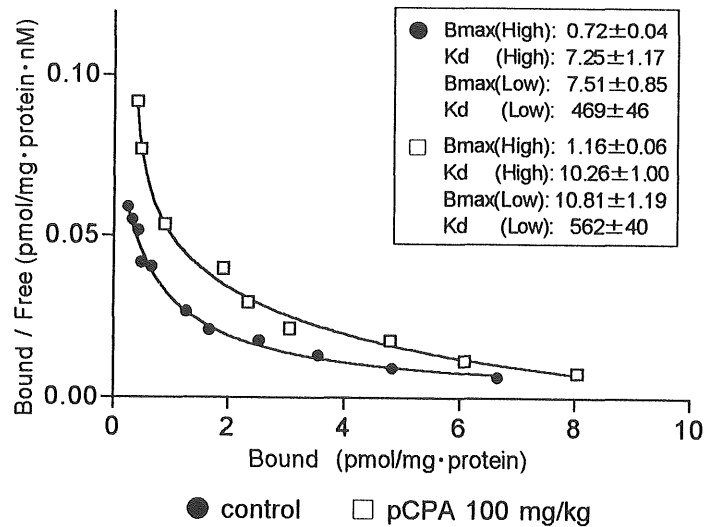


図 3. pCPA (100 mg/kg・体重) 投与群と対照群 (control) の大脳皮質全体から作成した粗シナプス膜分画に対する (S)-[³H]AMPA 結合実験のスカッチャードプロット. 図内にそれぞれの高親和性部位 (High) と低親和性部位 (Low) の B_{max} 値 (平均値 \pm s.d. (pmol/mg·protein)) および K_d 値 (平均値 \pm s.d. (nM)) を示す. $n = 5 - 6$.

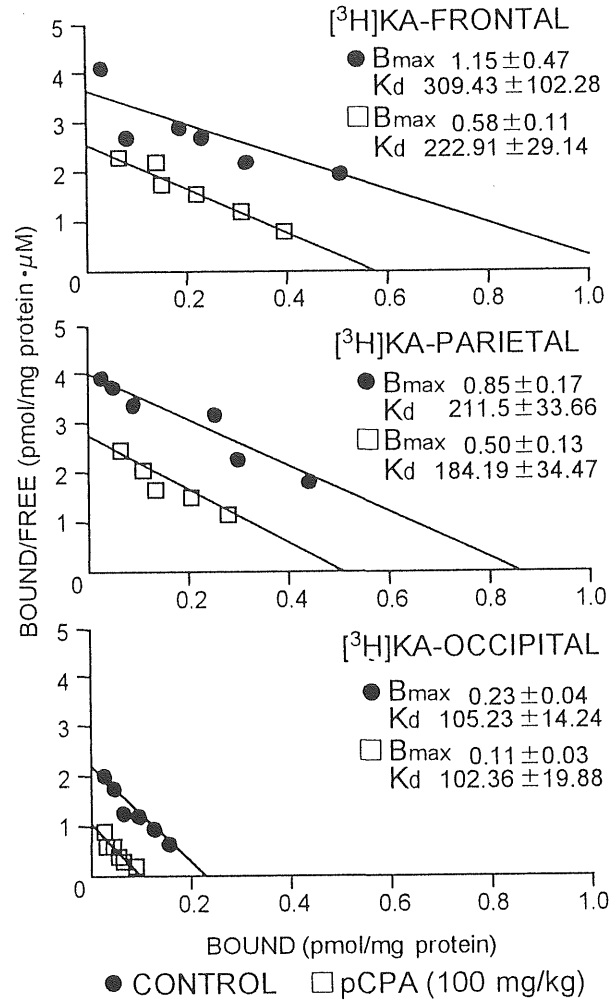


図 4. pCPA (100 mg/kg・体重) 投与群と対照群 (control) の大脳皮質前頭部, 頭頂部, 後頭部から作成した粗シナプス膜分画に対する [³H]カイニン酸 結合実験のスキッチャードプロット. 図内にそれぞれの B_{max} 値 (平均値 \pm s.d. (pmol/mg・protein)) および K_d 値 (平均値 \pm s.d. (nM)) を示す. $n = 3$.

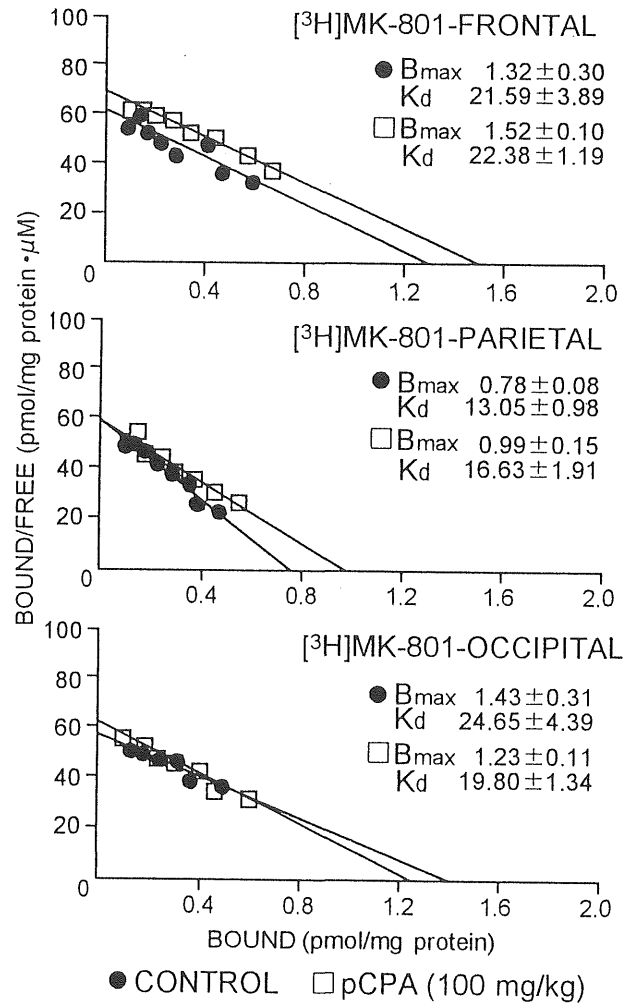
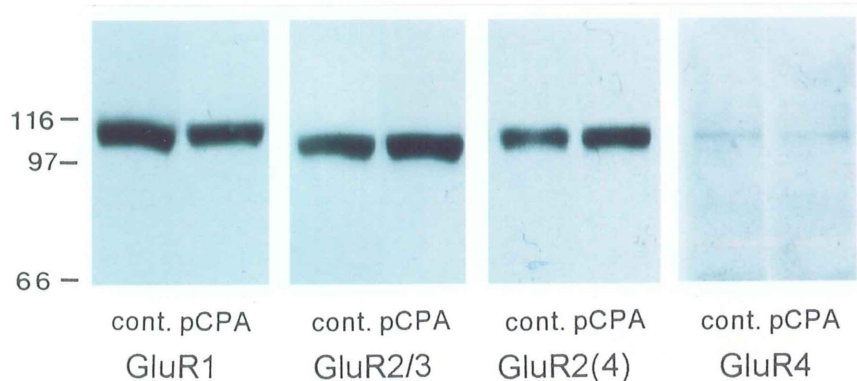
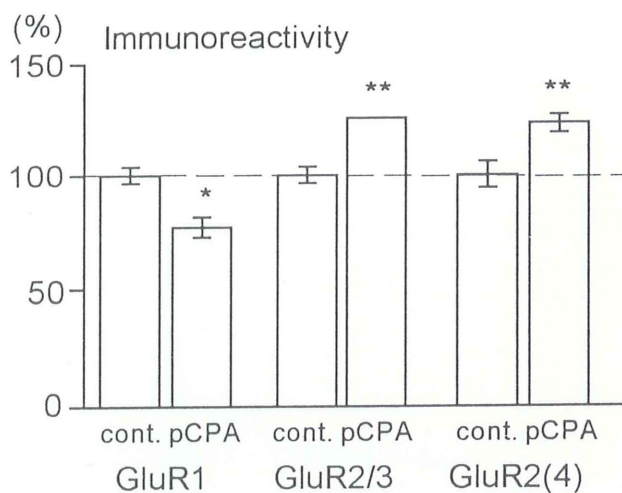


図5. pCPA (100 mg/kg・体重) 投与群と対照群 (control) の大脳皮質前頭部, 頭頂部, 後頭部から作成した粗シナプス膜分画に対する [³H]MK-801 結合実験のスカッチャードプロット. 図内にそれぞれの B_{max} 値 (平均値 \pm s.d. (pmol/mg・protein)) および K_d 値 (平均値 \pm s.d. (nM)) を示す. $n = 3$.

A



B



C

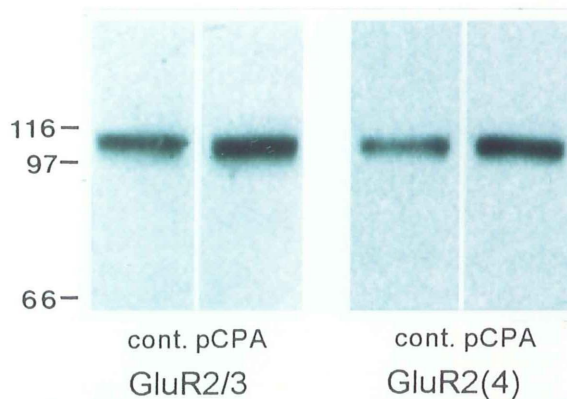
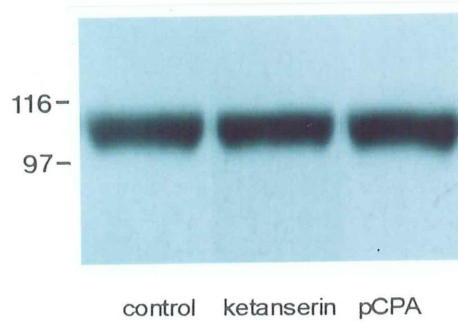


図 6. A: pCPA (100 mg/kg・体重) 投与群と対照群 (control) の大脳皮質全体から作成した粗シナプス膜分画に対する, 各受容体特異抗体のイムノブロット像. 左側に 66, 97, 116 kDa の分子量スタンダードを示す. B: A に示したイムノブロットの定量結果を示す. 平均値 \pm s.d., $n = 3 - 6$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. C: 大脳皮質を直接サンプルバッファー中でホモジェナイズして作製した膜標本に対する, GluR2/3 および GluR2(4) 受容体特異抗体のイムノブロット像. 左側に 66, 97, 116 kDa の分子量スタンダードを示す.

A



B

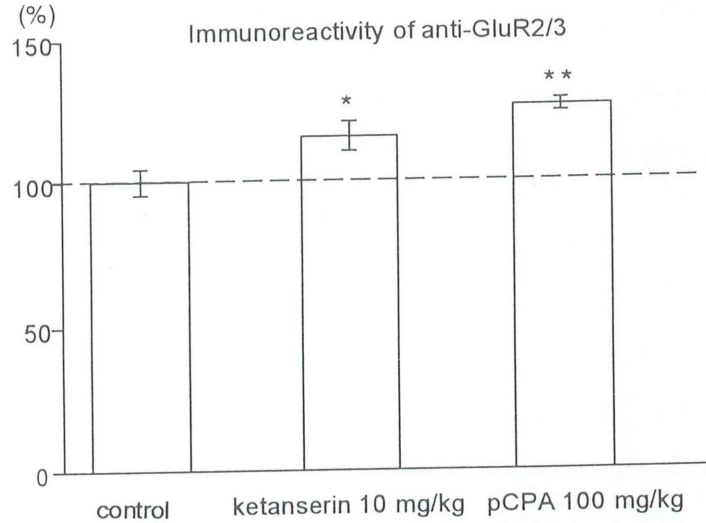


図 7. A: pCPA (100 mg/kg・体重) およびケタンセリン (10 mg/kg・体重) 投与群と対照群 (control) の大脳皮質全体から作成した粗シナプス膜分画に対する, GluR2/3 受容体特異抗体のイムノブロット像. 左側に 97, 116 kDa の分子量スタンダードを示す. B: A に示したイムノブロットの定量結果を示す. 平均値 \pm s.d., $n = 3$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

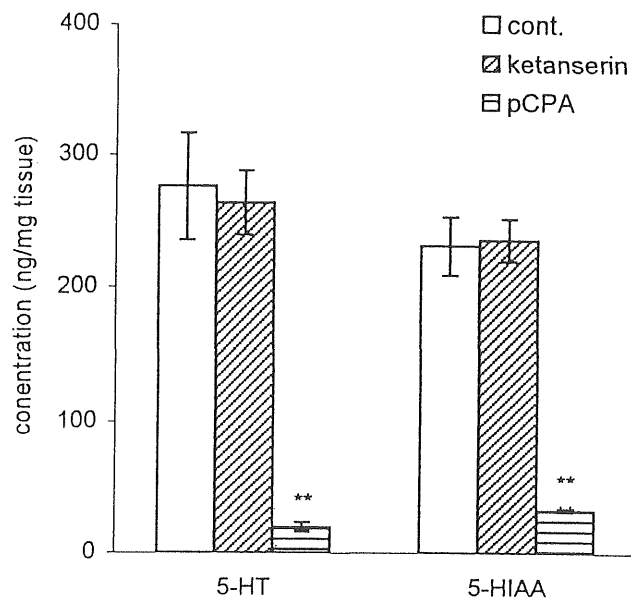
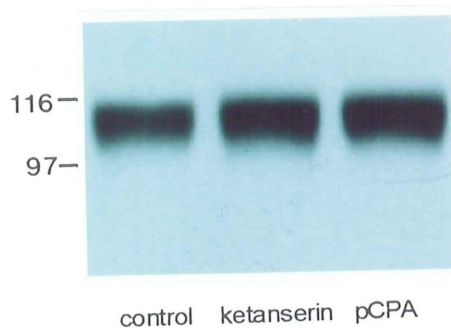


図 8. pCPA (100 mg/kg・体重) およびケタンセリン (10 mg/kg・体重) 投与 4 日後の被検群と対照群 (control) のセロトニン (5-HT) とその代謝物 5-ヒドロキシインドール酢酸 (5-HIAA) の大脳皮質内濃度. 平均値 \pm s.d., n = 3, ** p < 0.001.

A



B

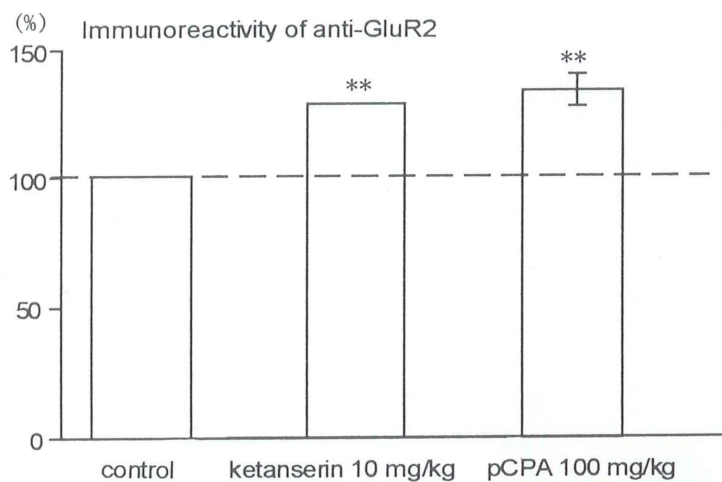


図 9. A: pCPA (100 mg/kg・体重) およびケタンセリン (10 mg/kg・体重) 4日間投与群と対照群 (control) の大脳皮質全体から作成した粗シナプス膜分画に対する, GluR2 受容体特異抗体のイムノブロット像. 左側に 97, 116 kDa の分子量スタンダードを示す. B: A に示したイムノブロットの定量結果を示す. 平均値 \pm s.d., $n = 3$, ** $p < 0.01$.

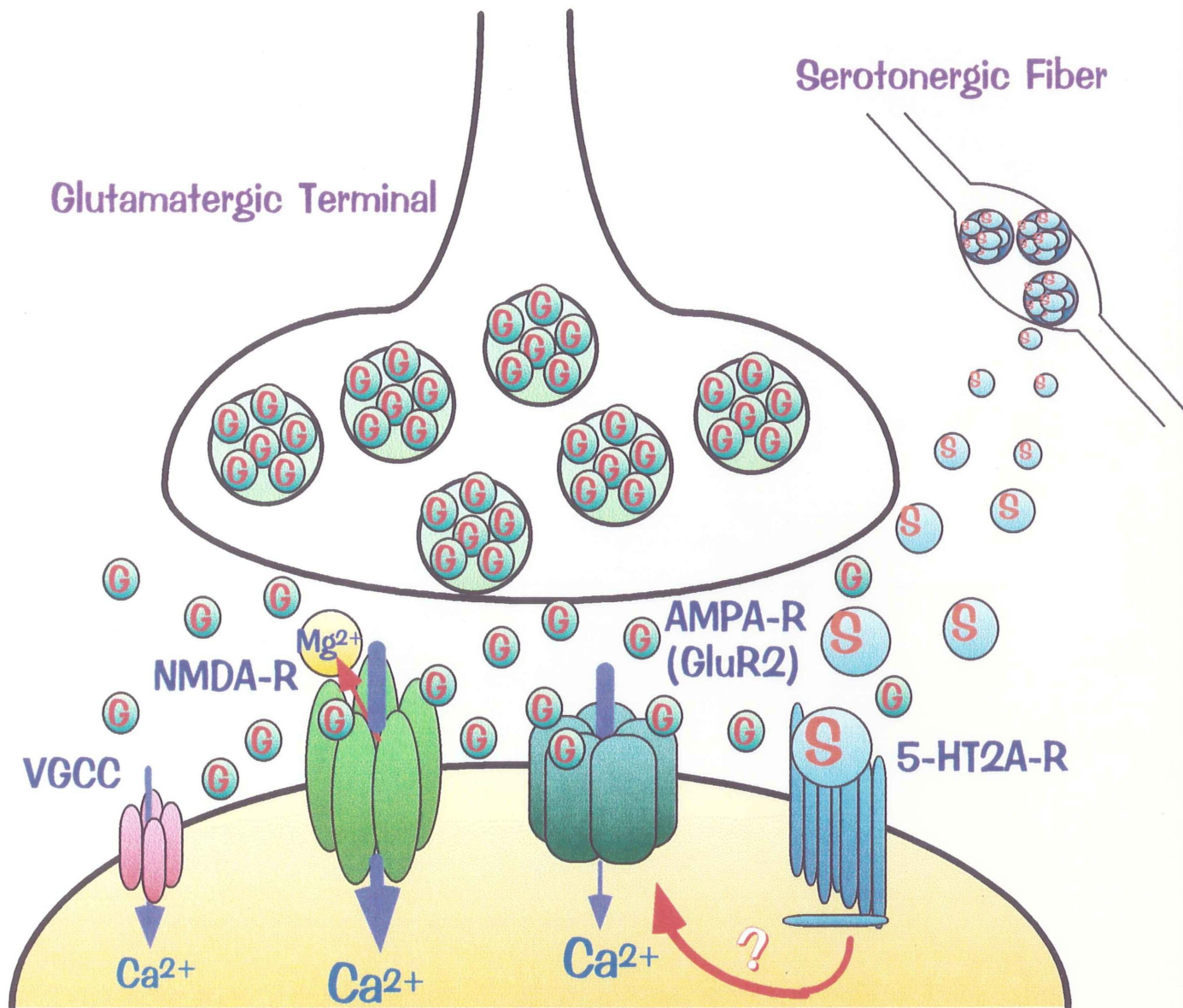


図10. セロトニンによる興奮性シナプスに対するヘテロシナプティック調節の模式図. セロトニン線維から放出されたセロトニン (S) が5-HT_{2A}型セロトニン受容体 (5-HT_{2A}-R) に結合して興奮性シナプスのGluR2AMPA型グルタミン酸受容体 (AMPA-R) に未知の機構を介して作用し, その発現調節を行っていると考えられる. AMPA型受容体は, NMDA型受容体 (NMDA-R) や Ca^{2+} チャンネル (VGCC) と共に興奮性シナプス後部での Ca^{2+} 流入を調節している.

(G:グルタミン酸, Mg^{2+} :マグネシウムイオンブロック)

表 1. pCPA 投与 7 日後の被検群と対照群 (control) のセロトニン (5-HT) とその代謝物 5-ヒドロキシインドール酢酸 (5-HIAA), およびノルアドレナリン (NA) とカテコールアミン代謝物 3,4-ジヒドロキシフェニル酢酸 (DOPAC) の大脳皮質内濃度. 平均値 \pm s.d., n = 6, * p < 0.05, *** p < 0.001.

	大脳皮質内濃度 (ng/mg·tissue)		
	control	pCPA 投与群	
		10 mg/kg	100 mg/kg
5-HT	201.28 \pm 30.89	175.67 \pm 7.31 *	5.39 \pm 12.06 ***
5-HIAA	128.84 \pm 23.40	109.39 \pm 11.45	2.16 \pm 4.83 ***
NA	676.03 \pm 70.26	694.88 \pm 50.87	586.33 \pm 114.63
DOPAC	142.76 \pm 98.39	148.26 \pm 79.35	123.50 \pm 87.34

表 2. pCPA (100 mg/kg・体重) およびケタンセリン (10 mg/kg・体重) 投与 4 日後の被検群と対照群 (control) のセロトニン (5-HT) とその代謝物 5-ヒドロキシインドール酢酸 (5-HIAA) の大脳皮質内濃度. 平均値 \pm s.d., n = 3, ** p < 0.001.

	大脳皮質内濃度 (ng/mg・tissue)		
	control	ケタンセリン	pCPA
5-HT	276.02 \pm 40.57	263.63 \pm 24.27	19.59 \pm 3.58 **
5-HIAA	230.83 \pm 21.93	235.37 \pm 15.94	32.48 \pm 0.80 **